动　物　学　研　究　2010，Aug. 31(4): 387−394　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2010.04387

松江鲈肌肉生长抑制素基因克隆和序列特征分析

卢祥云[1]，张　营[1]，王星果[1]，张燕萍[1]，徐建荣[1]，赖　仞[2]，顾志良[1,*]

(1. 常熟理工学院 生物科学与工程系，江苏 常熟　215500；2. 中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明　650223)

摘要：肌肉生长抑制素 (myostatin) 属于转化生长因子 β(TGF-β)超家族中的一个成员，是控制骨骼肌生长发育的重要细胞因子。该研究以松江鲈肌肉总 RNA 为模板，采用 RT-PCR、5'-RACE 和 3'-RACE 的方法，获得了松江鲈 *MSTN* 基因的 3 个片段，测序后拼接得到 2568 bp 全长 cDNA 序列，其包含了 1131 个核苷酸的开放性阅读框，翻译编码 376 个氨基酸。松江鲈 MSTN 具有 MSTN 的共同特征，有蛋白酶水解位点 RARR 和 10 个保守的半胱氨酸残基；核苷酸和氨基酸同源性分析发现，松江鲈 *MSTN* 基因序列与石首鱼、条纹狼鲈、美洲白鲈、金眼石鮨等同源性较高；与哺乳动物和鸟类同源性较低。系统发育分析表明，松江鲈 MSTN 与石首鱼亲缘关系最近。RT-PCR 分析表明，该基因在肌肉表达量最高；在肠中也有较高表达；在脑和肝脏中也能检测到表达。此结果表明，松江鲈 *MSTN* 基因除对肌肉生长发育有调控作用以外，可能还有其他功能。

关键词: 松江鲈；肌肉生长抑制素；RACE；组织表达
中图分类号：Q959.483; Q78; Q951.3; Q341; S917.4　**文献标志码**：A　**文章编号**：0254-5853-(2010)04-0387-08

Identification and Characterization of Myostatin Gene in Rough-skinned Sculp, *Trachidermus fasciatus*

LU Xiang-Yun[1], ZHANG Ying[1], WANG Xing-Guo[1], ZHANG Yan-Ping[1], XU Jian-Rong[1], LAI Ren[2], GU Zhi-Liang[1,*]

(1. *Department of Life Science and Technology, Changshu Institute of Technology, Changshu*　215500，*China;*
2. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming*　650223，*China*)

Abstract: Myostatin is a member of the TGF-β superfamily and acts as a negative regulator of skeletal muscle growth. The characterization of the myostatin gene and its expression in *Trachidermus fasciatus* was reported in the current study. A full-length of 2568 bp myostatin cDNA sequence in *T. fasciats* was cloned by 5' and 3' RACE, which included a 1131 bp complete ORF encoding a 376 amino acid peptide, a 106 bp long 5'-UTR and a 1331 bp long 3'UTR. As other MSTN, the putative peptide contains a 22 amino acids long signal peptide, a conserved RARR proteolytic processing site, and 10 conserved cysteine residues in the C terminal of the protein. The *Trachidermus fasciatus* MSTN has high homology with *Umbrina cirrosa, Morone saxatilis, Morone americana, Morone chrysops* myostatin while has low homology with mammalian and birds myostatin. The phylogenetic analysis showed that the *T. fasciatus* myostatin had the closest relationship with *U. cirrosa.* In the four examined tissues, the myostatin gene was highly expressed in muscle and intestine and weakly expressed in brain and liver. These results suggested that the fish myostatin gene might not only play roles in muscle development but also contribute to other biological functions.

Key words : *Trachidermus fasciatus;* Myostatin; RACE (rapid amplify cDNA end); Tissue expressional pattern

松江鲈(*Trachidermus fasciatus)*属鲉形目杜父鱼科松江鲈属，是中国四大淡水名鱼之一，已被列入国家二级保护动物。由于不断造闸建坝和不断增加的水源污染，严重影响了松江鲈的生存环境，已濒临灭绝。目前对松江鲈的研究主要集中在繁育、遗传多样性和胚胎发育等方面(Xu et al，2009；Wang

收稿日期：2009-12-08；接受日期：2010-07-13
基金项目：江苏省高校自然科学研究计划(09KJD240001)；苏州市农业科技支撑项目(SNG0913)
*通讯作者(Corresponding author)，博士，教授。研究方向为动物分子遗传学。E-mail: Zhilianggu88@hotmail.com
第一作者简介：卢祥云(1962 一)，本科，副教授，研究方向为动物生物学。Luxy@cslg.edu.cn

et al，2004)。

肌肉生长抑制素(myostatin， MSTN)，是McPherron等人首先克隆的。蛋白质同源性比较证明，肌肉生长抑制素属于TGF-β(transforming growth factor β，转化生长因子 β)超家族中的一个新成员(McPherron et al，1997)。进一步研究发现，肌肉生长抑制素主要在小鼠的骨骼肌中表达。利用基因敲除技术研究它的功能发现，*MSTN* 基因敲除鼠的骨骼肌是正常野生型小鼠的3倍以上。突变型小鼠骨骼肌肌纤维的数目比野生小鼠高出 86%(P<0.01)，表明突变小鼠骨骼肌肥大的原因既有肌细胞的增生，也有肌纤维的肥大(McPherron et al，1997；Szabo et al，1998)。McPherron et al(1997)和 Szabo et al（1998)的研究结果表明，*MSTN* 在调控骨骼肌肉的生长发育中起着十分重要的作用。

MSTN 的功能也在比利时蓝牛得到了验证(Lee & McPherron，2001；Westhusin，1997)。经长期遗传选育的双肌臀比利时蓝牛具有十分强壮的骨骼肌，由于肌肉增生(肌纤维数目增加)使这种牛的肌肉比其它品种的高20%。尽管人们已知双肌牛是由常染色体上隐性基因控制的，但其分子遗传的机理直到 *MSTN* 基因的发现后才有所揭示。我们发现鸡 *MSTN* 基因 5'调控区的单核苷酸多态性与肌肉和脂肪的生长发育有显著关系(Gu et al，2004b)。鱼类 *MSTN* 的研究也有许多，现已经在斑马鱼、虹鳟鱼、大麻哈鱼、金头鲷(*Sparus aurata*)、莫桑比克罗非鱼等鱼类中克隆到 *MSTN* 基因(Gu et al，2004a；Maccatrozzo et al，2001；Roberts et al，2001；Rodgers et al，2001a；Rodgers et al，2001b；Rescan et al，2001)，一些鱼类，如鲑、鳟鱼类在系统发生过程中，有基因重复发生，其 MSTN 有两个异构体(Rescan et al，2001)。

MSTN 作为骨骼肌生长发育的负调节因子(McPherron et al，1997)，引起生物界科学家广泛关注。研究 *MSTN* 基因的结构和功能对阐明骨骼肌生长发育的调控机理具有十分重要理论意义，同时将为畜牧和水产等肉用类动物的育种开辟一条新途径。而松江鲈 *MSTN* 基因的研究尚未见报道。

鉴于 *MSTN* 基因在畜牧水产中的重要意义，以及对松江鲈的研究现状，本文对松江鲈 *MSTN* 基因的克隆、不同组织表达情况进行研究，将会对松江鲈的繁育工作起到积极的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及总 RNA 提取

采集松江鲈的肌肉、肝脏、肠和脑等4种组织，液氮速冻后于−80℃冰箱中保存。采用Trizol(Invitrogen， USA)分别提取上述组织的总RNA，保存于−80℃冰箱备用。

1.2 引物的设计和合成

根据GenBank登录的石首鱼(AF316882)、斑马鱼(AF019626)等的 *MSTN* 基因序列设计引物：fimstnf1: 5'-cgtcttggcaaagtatagac-3'；fimstnr1: 5'-gcatgttgatgggcgacatc-3'，用于扩增 *MSTN*cDNA 部分序列。根据获得的部分松江鲈 *MSTN* 基因的序列设计用于 5'-RACE 和 3'-RACE 的特异性引物为 sjlmstn-gsp2r：5'-attcctctcgaatcgaaggc-3'，sjlmstn-gsp2f：5'-gcaaccgttcatggaggtga-3'。扩增松江鲈 β-*acti*n 基因的引物为 CaBactinF：5'-ccagatcatgtt-cgagaccttc-3'，caBactinR：5'-gaacctctcattgccaatggtg-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物 3′race outer primer: 5'- taccgtcgttccactagtga-ttt-3'，3′race inner primer：5'-cgcggatcctccactagtgattt-cactatagg-3'; 5′race outer primer: 5'-catggctacatgctgac-agccta-3'，5′race inner primer: 5'-cgcggatccacagcctact-gatgatcagtcgatg-3' 分别来自于 TAKARA 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 和 5'-Full RACE Kit 试剂盒。

1.3 RT-PCR 和 5′-RACE、3′-RACE

反转录按 TaKaRa 反转录试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0.)要求进行，反应体系为：2 μL $MgCl_2$ (25 mmol/L)，1 μL 10×RT Buffer, 1 μL dNTP Mixture(各 10 mmol/L)，0.25 μL RNase Inhibitor，0.5 μL AMV Reverse Transcriptase，0.5 μL Random 9 mers，1 μg 总 RNA，加 RNAseFree 超纯水至总反应体积为 10 μL。反应程序为：30℃ 10 min。42℃ 30 min。99℃ 5 min。5℃ 5 min。以合成的 cDNA 为模板和引物 fimstnf1/fimstnr1 扩增松江鲈 *MSTN* 基因 450 bp 片段，反应体系为；10×PCR buffer 2.5 μL，10mmol/L dNTPs 2 μL，10 μmol/L 引物 fimstnf1/r1 各 1 μL，rTaq(5 U/μL)1 μL，1 μL cDNA，dd H_2O 17.3 μL。PCR 程序为：94℃ 5 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 1 min，共35个循环；72℃ 8 min，4℃保温。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳，并回收克隆后测序。

5′-RACE按TAKARA 5′-Full RACE试剂盒程序

进行：将制备的cDNA用5′race outer primer/ fimstnr1进行第一轮扩增，再以5′race inner primer/sjlmstn–gsp2r引物对第一轮的PCR产物巢式PCR。PCR产物再1%琼脂糖凝胶中电泳，并回收克隆后测序。3′-RACE按TAKARA 3′-Full RACE Core Set Ver.2.0试剂盒程序进行：先合成的cDNA用引物fimstnf1/3′RACE Outer Primer进行第一轮扩增，然后用sjlmstn-gsp2f/3′RACE Inner Primer进行第二轮巢式PCR扩增，PCR产物再1%琼脂糖凝胶中电泳，并回收克隆后测序。

1.4 不同组织 mRNA 表达的 RT-PCR 检测

RT-PCR方法检测不同组织mRNA的表达分布方法如下：反转录按TaKaRa反转录试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0)要求进行(同1.3段)。RT-PCR时，松江鲈*MSTN*基因引物fimstnf1/fimstnr1，两条引物分别位于不同的外显子上，以β-肌动蛋白基因(β-*actin*)为内标。PCR反应体系和条件：0.2 μL rTaq聚合酶(5 U/μL)(Takara, 大连)，2.5 μL 10×PCR Buffer (without Mg^{2+})，2 μL dNTP (2.5 mmol/L each)，1.5 μL $MgCl_2$ (25 mmol/L)，上、下游引物各1 μL (10 pmol/L)，1 μL cDNA，加灭菌ddH_2O至25 μL。 PCR扩增条件：95℃变性5 min，95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，25个循环(β-*actin*基因)或34个循环(*MSTN*基因)；72℃延伸10 min，4℃保存。

1.5 统计分析及软件

将获得的序列在DNAMAN 5.0软件上进行分析，并进行物种间同源性比较。利用MEGA 4.1软件中的Kimura 2-parameter法计算净遗传距离矩阵。以距离矩阵邻接法(Neighbour-Joining，NJ)建系统发生树，通过自引导检验(bootstrap)获得系统分支的置信度(重复次数为1000)。

2 结果与分析

2.1 松江鲈 myostatin RT-PCR 扩增

以松江鲈肌肉总 RNA 为模板，经逆转录后得到 cDNA，用引物 fimstnf1/r1 进行 PCR 扩增，PCR产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳检测(图 1)。电泳检测结果显示，得到 450 bp PCR 扩增产物，与设计的目的片段长度相同，将该片段回收后克隆到 pMD-18T载体中，测序后获得了该片段的核苷酸序列，经与其他物种的 *MSTN* 基因比对，确认该序列为松江鲈 *MSTN* 基因的编码区部分序列。

2.2 松江鲈 *MSTN* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增

以松江鲈肌肉总 RNA 为模板，经过 5'-RACE 和 3'-RACE 的各两轮 PCR，分别得到了 800 bp 和 1.8 kb 较亮的条带， 与试验预期的结果较接近(图 2)。通过对上述两个片段回收后克隆到 pMD-18T 载体中，经测序后获得了该片段的核苷酸序列，经与 *MSTN* 基因比对，确认这两条序列分别为松江鲈 *MSTN* 基因的 5'和 3'端序列。

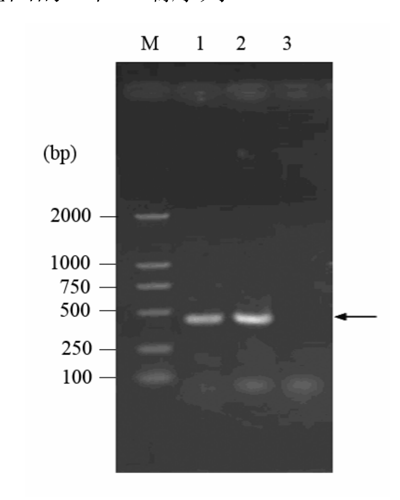


图 1 松江鲈 *MSTN* 基因 RT-PCR 产物的 1%琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 RT-PCR products of myostatin gene in *Trachidermus fasciatus* checked by 1% agarose gel electrophoresis

M：DL-2000 相对分子质量标准；1、2：RT-PCR 扩增产物；3：阴性对照(M: DL-2000 DNA Marker; Lane 1, 2,: RT-PCR products; Lane 3: negative control).

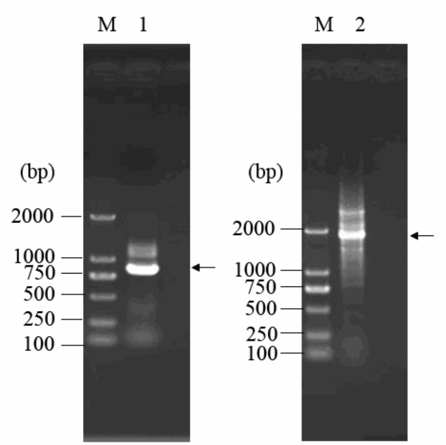


图 2 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增的松江鲈 *MSTN* 基因 cDNA5'-端和 3'-端序列

Fig. 2 The amplification results of *Trachidermus fasciatus* myostatin cDNA by 5'-RACE and 3'-RACE methods

M：DL-2000 相对分子质量标准；1, 5'-RACE 扩增产物；2, 3'-RACE 扩增产物(M: DL-2000 DNA Marker; Lane1, 5'-RACE products; Lane 2, 3'-RACE products)。

2.3 松江鲈 *MSTN* 基因全长 cDNA 和氨基酸的序列分析

上述3个扩增片段经克隆后测序，拼接获得了2568 bp全长cDNA序列。包含了1 131个核苷酸的开放性阅读框，其起始密码子是ATG，终止密码子是TAG，翻译编码376个氨基酸，相应的蛋白序列见图3。经分析信号肽切割位点在S22和D23之间，大小为22个氨基酸；松江鲈MSTN有一个蛋白酶水解位点RARR(第264～267位)，在C端生物活性区含有10个保守的半胱氨酸残基，依次为第273、282、283、310、314、340、341、362、373、375位氨基酸(图3)，其蛋白等电点为5.71，相对分子质量为42 k。5'-UTR区为106 bp，3'-UTR区为1331 bp，包含着一个AATAA的典型的转录终止加A信号(该序列在Genbank中登录号为: GU198192)。Blastp分析发现，松江鲈MSTN包含两个典型的TGF-β蛋白结构域：TGF-β前肽区域(41～256位)和TGF-β功能域(282～376位)。

松江鲈*MSTN*基因与其它物种的同源性为：人60.74%，家鼠61.63%，鸡61.61%，斑马鱼75.60%，虹鳟Ⅰ型79.22%，虹鳟Ⅱ型79.05%，美洲白鲈92.13%，金鲷67.93%，红鳍东方鲀Ⅰ型86.51%，红鳍东方鲀Ⅱ型64.01%。松江鲈MSTN与其他鱼类相关蛋白质的同源性为62.17%～93.88%，与石首鱼MSTN同源性最高达93.88%；与其他各蛋白质的同源性依次为条纹狼鲈MSTN、美洲白鲈MSTN、金眼石鮨MSTN、大西洋鲑MSTN2、虹鳟MSTN、红鳍东方鲀MSTN2和斑马鱼等；松江鲈MSTN与人、小鼠和鸡MSTN分别为61.74%、61.32%和62.53%，结果见表1。

表 1 松江鲈与其他动物 *MSTN* 基因编码区的同源性比较

Tab. 1 Homologous comparisons of myostatin gene CDS between *Trachidermus fasciatus* and other species

物种 Species	GenBank登录号 Accession no.	碱基同源性(%) Nucleotide homology	氨基酸同源性(%) Amino acid homology	编码氨基酸的长度 Length of peptide
大西洋鲑 *Salmo salar 1a*	AJ344158	78.92	83.51	373
大西洋鲑 *Salmo salar 1b*	AJ297267	78.67	81.91	373
虹鳟(MSTN2) *Oncorhynchus mykiss*	AF273036	79.05	82.71	373
虹鳟(MSTN1)*Oncorhynchus mykiss*	AF273035	79.22	83.78	373
斑马鱼 *Danio rerio*	AF019626	75.60	80.05	374
金鲷 *Sparus aurata 2*	AY046314	67.93	64.72	359
条纹狼鲈 *Morone saxatilis*	AF290910	92.13	93.09	376
美洲白鲈 *Morone americana*	AF290911	92.13	93.09	376
金眼石鮨 *Morone chrysops*	AF197194	91.89	91.25	377
莫桑比克罗非鱼 *Tilapia mossambica*	AF197193	86.38	88.03	376
鲤鱼 *Cyprinus carpio*	GU014395	75.77	80.85	375
石首鱼 *Umbrina cirrosa*	AF316882	92.22	93.88	376
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes1*	NM001032672	86.51	86.17	376
红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes2*	NM001032671	64.01	62.17	359
人 *Homo sapiens*	NM005259	60.74	61.74	375
小鼠 *Mus musculus*	NM010834	61.63	61.32	376
大鼠 *Rattus norvegicus*	AF019624	61.11	61.32	376
鸡 *Gallus gallus*	AY448007	61.61	62.53	375
鹌鹑 *Coturnix chinensis*	AF440864	60.91	62.01	375

2.4 Myostatin 的系统发育分析

为分析松江鲈与其他物种 MSTN 的进化关系，根据我们克隆和测序的松江鲈*MSTN*基因编码区推断的蛋白质氨基酸序列，并采集 GenBank 中其它物种包括人、小鼠、大鼠、鸡、鹌鹑和斑马鱼、石首鱼、红鳍东方鲀、虹鳟鱼、美洲白鲈(*M. americana*)、大西洋鲑等脊椎动物的 MSTN 序列，去除信号肽后，利用 MEGA4.1 软件构建了 19 种脊椎动物 MSTN 的分子进化树(图 4)。表明所有硬骨鱼类形成一个分枝，哺乳类和鸟类形成另一个分支。在硬骨鱼类分枝中，松江鲈 MSTN 与石首鱼 MSTN 关系最近，松江鲈 MSTN 先与石首鱼聚为一枝，再与条纹狼鲈(*M. saxatilis*)、美洲白鲈和金眼石鮨(*M. chrysops*)聚在一起，并有很高的自展值支持。而与河鲀鱼 MSTN 的遗传距离较远，说明其亲缘关系也较远。石首鱼、金眼石鮨、条纹狼鲈和美洲白鲈，

```
1     GAAAGCCTATCAGAGTGCGACATTAATCCAAACCCAGTACAGTCGAGCAGCAGGTCCAGC
61    ACACACCAAGGGATCCTTTGAAACCGAACTGCACACCTTAGAGACAATGTATCTGTCTCA
                                                    M  Y  L  S  Q
121   GACTGTGCTGTGTCTTAGCTTGCTGATTGCTTTGGGTCCAGTAGTTTTGAGTGACCAAGA
       T  V  L  C  L  S  L  L  I  A  L  G  P  V  V  L  S  D  Q  E
181   GACGCACCAGCAGCCCTCCGTCACCAGCCCAGAAGACACGGAGCAGTGCGCCACCTGCGA
        T  H  Q  Q  P  S  V  T  S  P  E  D  T  E  Q  C  A  T  C  E
241   GGTCCGGCAGCAGATCAAAACCATGCGACTGAACGCAATCAAATCGCAGATTTTGAGCAA
        V  R  Q  Q  I  K  T  M  R  L  N  A  I  K  S  Q  I  L  S  K
301   ACTGCGAATGAAAGAATCTCCCAACATCAGCCGAGACATCGTGAAGCAGCTCCTGCCCAA
       L  R  M  K  E  S  P  N  I  S  R  D  I  V  K  Q  L  L  P  K
361   AGCGCCGCCGCTGCAGCAGCTTTTGGACCAGTACGACGTGCTGGGTGATGACAACAAGGA
        A  P  P  L  Q  Q  L  L  D  Q  Y  D  V  L  G  D  D  N  K  D
421   TGTGGTAATGGAGGAGGACGGCGAGCATGCCATCACGGAGACCATAATGATGATGGCCAC
        V  V  M  E  E  D  G  E  H  A  I  T  E  T  I  M  M  M  A  T
481   TGCACCCGAGTCCATCGTCCAAGCGGACGGGGAACCAAAGTGCTGCCTTTTCTCTTTTAC
        A  P  E  S  I  V  Q  A  D  G  E  P  K  C  C  L  F  S  F  T
541   TCAAAAGTTCCAAGCCAATCGCATCGTCCGAGCTCAGCTCTGGGTTAATCTGCGGCCGTC
        Q  K  F  Q  A  N  R  I  V  R  A  Q  L  W  V  N  L  R  P  S
601   GGACGAGGCGACCACTGTGTTCCTCCAAATCTCACGCCTGATGCCGGTTTCAGGCGGGAG
        D  E  A  T  T  V  F  L  Q  I  S  R  L  M  P  V  S  G  G  S
661   CCGGCACATACGCATCCGCTCCCTGAAGATCGACGTGAATGCCGGCGTCAGCTCTTGGCA
        R  H  I  R  I  R  S  L  K  I  D  V  N  A  G  V  S  S  W  Q
721   AAGTATAGACGTCAAACAAGTGTTGACTGTGTGGCTGCGGCAGCCGGAGACCAACTGGGG
        S  I  D  V  K  Q  V  L  T  V  W  L  R  Q  P  E  T  N  W  G
781   CATCGAGATTAATGCCTTCGATTCGAGAGGAAATGACTTGGCCGTGACCTCCACAGAGCC
        I  E  I  N  A  F  D  S  R  G  N  D  L  A  V  T  S  T  E  P
841   CGGAGAGGAAGGACTGCAACCGTTCATGGAGGTGAAGGTCTCCGAGGGCCCCCGGCGTGC
        G  E  E  G  L  Q  P  F  M  E  V  K  V  S  E  G  P  R  R  A
901   CAGGAGAGACTCAGGCCTGGATTGTGACGAGAACTCTCTAGAGTCCCGGTGCTGCCGCTA
        R  R  D  S  G  L  D  C  D  E  N  S  L  E  S  R  C  C  R  Y
961   CCCGCTCACCGTGGACTTTGAAGACTTTGGTTGGGACTGGATTATTGCTCCAAAACGCTA
        P  L  T  V  D  F  E  D  F  G  W  D  W  I  I  A  P  K  R  Y
1021  CAAGGCCAACTATTGCTCCGGGGAGTGTGAGTACATGCACTTGCAGAAGTATCCGCACAC
        K  A  N  Y  C  S  G  E  C  E  Y  M  H  L  Q  K  Y  P  H  T
1081  CCACCTGGTGAACAAGGCCAACCCCAGAGGGAACGCTGGTCCCTGTTGCACTCCCACAAA
        H  L  V  N  K  A  N  P  R  G  N  A  G  P  C  C  T  P  T  K
1141  GATGTCGCCCATCAACATGCTCTACTTTAACCGAAAAGAGCAGATCATTTGCGGCAAGAT
        M  S  P  I  N  M  L  Y  F  N  R  K  E  Q  I  I  C  G  K  I
1201  CCCTTCCATGGTGGTGGACCGCTGTGGATGCTCTTGAGTTGGGACGAAGACCCTGGTGAG
        P  S  M  V  V  D  R  C  G  C  S  *
1261  AGGAAGCAGGGAGGACAGAGGGGGTGGTGGTTTTGTCCGTCCTCCGACTTCAAACTTTTT
1321  AACACAACCAATCCACCAGTTCCAATGCTTTCCTGCAGAACACAGTGCAGTAGAACCAGA
1381  GTAGAGGTCACAATCCGCCCGACCTTCCTGTAGGGCTGCACTTTCACAACCGGCATAGAT
1441  CTTACTTTTCTTTCCTCCAGTGAAATCTTAGCCATAGAGACTTGAAGTCAGATGGATGCA
1501  GAAACATACGTACACACACACTTGCACGAGTCGAACCTTGGAGGGAATGTAGACAGAAAT
1561  AATCAAAGTTATCCAAAAACTGTTTTTCTCCCATTTATACACACATGCCGACAGATTATA
1621  CTCATATGCCATCACCTCCACTCCATTTCACTTGTAGCCAACATAAAAGCTATTGCACTT
1681  CTTGCTATCTGATATGTGTTTTGCTAATCATTTTTCAAGTTATGTTTTCGGAGTGAAACC
1741  AGGAATCCTCATGGACTTTTTCAAAGGGCTTGGAAAAACACAACTGGAGACTCATAGGGG
1801  GGATATTTCACATGGATAGAACATGTGTTGGTGCAAATAGGGTCTCAGGACTTGATAAAA
1861  AGATGAAAACTGGCTGCAAGGCAAACCCTTAGTCACTCCCATATTAATTTAATTGCATCA
1921  CTAGTTTGGAAGAGTAAATGCAAGGCATTATCTTTCTTGTATTGCATTAAATTTTAAGTT
1981  CTCATTTTGGGAATGCAAACCGAAACAGAGGCAGTGACGTGGTGGTTGGTCAGTCCTGAT
2041  ATCCTATTTATAAAAACACGTTCCACCAGGGTGAAATACCACTTTAGGTCTGTACACATT
2101  TTCATGTACTCTTCACTATACAACAAAACAGCCTGACCCTGGACCCTGCTCGATACACTT
2161  GAATTATTCTGATTGTAAATTCACATGACTGGACAGAAGGACTTGAACTGAAGGCACAGT
2221  GAATGCAGCCTATAAAGGAAAATAAATGTGTTTAAGACAGAGAAAATGGATTGTCGAGAA
2281  TGAATGTTGAGATCATGCTTAAACTCTGTCTACAAACAACACAGTTTGCACTATGGCACA
2341  CCAATAGAAAAAATTGGTTGCTACAAAAGTTGTAAAAACTGATTTTGATATGTTTGCTAA
2401  TTTGTATTGTATACATATATCATTGTTTCCATTAGAAGTTGCCTTTCTAAACCACCTGTT
2461  GGTAAATGTATAAAACCACAATCTAGCAAGATAAATGTAATGCAGCAACTCTATATACTT
2521  GTTTTAACAAATAAAGTTTCTAGCTTGTTTGTTGAAAAAAAAAAAAAA
```

图 3　松江鲈 *MSTN* 基因序列和 MSTN 的氨基酸序列

Fig. 3　Nucleotide sequence of myostatin gene and putative amino acid sequence of MSTN in *Trachidermus fasciatus*

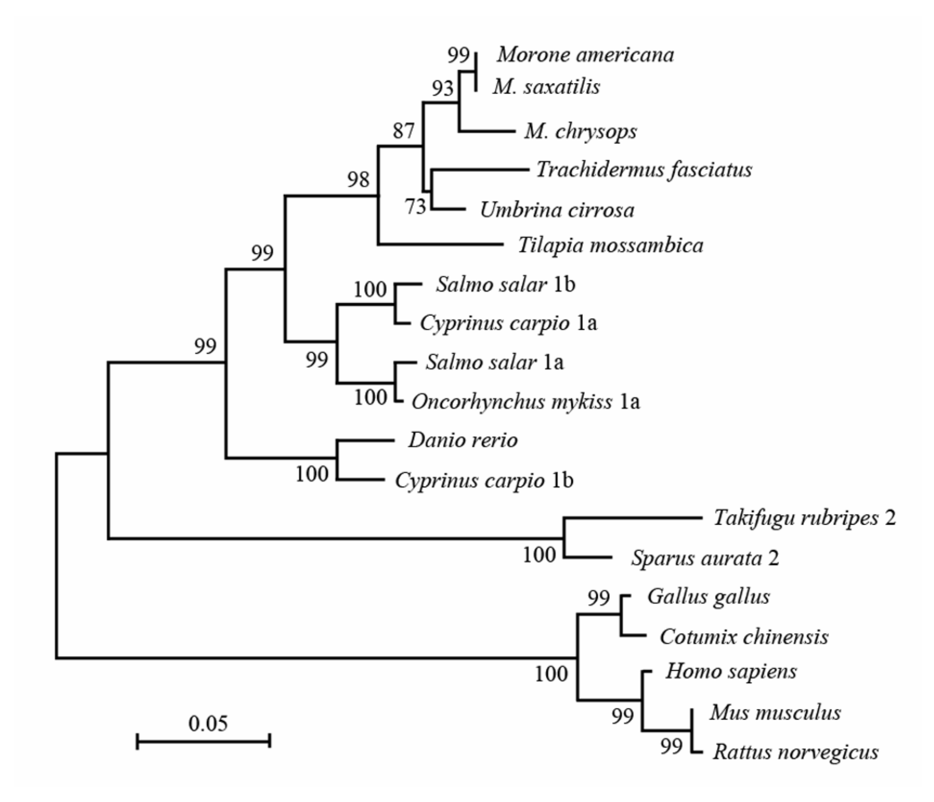


图 4 不同物种推导的 MSTN 氨基酸序列构建的 NJ 树

Fig. 4 Neighbour-Join Tree reconstructed based on putative MSTN amino acid residues

枝节点上的数字表示 1000 次自展检验置信值(Numbers on nodes corresponding to percentage bootstrap values for 1000 replicates)。MSTN 序列来自 GenBank (The MSTN sequences are from GenBank)。大西洋鲑 *Salmo salar* 1a： AJ344158；大西洋鲑 *Salmo salar* 1b：AJ297267；虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 1a：DQ136028；斑马鱼 *Danio rerio*，AF019626；金鲷 *Sparus aurata* 2:：AY046314；条纹狼鲈 *Morone saxatilis*：AF290910； 美洲白鲈 *Morone americana*：AF290911；金眼石鮨 *Morone chrysops*：AF197194；莫桑比克罗非鱼 *Tilapia mossambica*：AF197193；鲤鱼 *Cyprinus carpio* 1a：GU014395；鲤鱼 1b：GU014396；石首鱼 *Umbrina cirrosa*：AF316882；红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes* 2：NM001032671；松江鲈 *Trachidermus fasciatus*：GU198192；人 *Homo sapiens*：NM005259；小鼠 *Mus musculus*：NM010834；大鼠 *Rattus norvegicus*：AF019624；鸡 *Gallus gallus*：AY448007；鹌鹑 *Coturnix chinensis*：AF440864。

这几种鱼类都属于鲈形目。物种 MSTN 系统发育与物种间的亲缘关系一致。

2.5 松江鲈的 *MSTN* 基因的组织表达分析

采用半定量RT-PCR方法，检测了*MSTN*基因mRNA在松江鲈肌肉、脑、肠和肝脏等不同组织的表达情况，同时以β-肌动蛋白基因(β-*actin*)的表达作为内参照(图5)。 通过PCR条件优化，分别选择β-*actin*基因和*MSTN*基因在扩增进入平台期前的循环数为25次和34次。结果发现在肌肉中*MSTN* mRNA表达量最高，肠组织中的表达量次之，脑有微量的表达，肝脏中有痕量表达。

3 讨 论

TGF-β超家族成员结构上具有共同的特点：1)在蛋白的N-末端有相同的非亲水性氨基酸序列，作为分泌信号；2)在C-末端有保守的蛋白酶水解位点RXXR；3)一般有9个半胱氨酸位于C-末端形成“半胱氨酸节点”；4)其C端通过形成二硫键组成具有生物学活性的二聚体发挥功能(McPherron, 1997)。我们克隆并测序的全长松江鲈*MSTN*基因cDNA与TGF-β超家族其他成员一样，在不同物种间高度保守，推断的氨基酸序列中含有一个蛋白酶水解位点

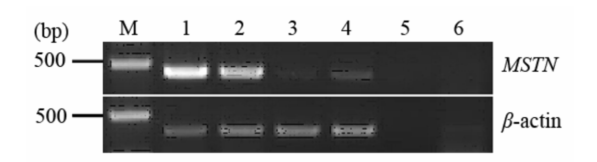


图 5 松江鲈 *MSTN* 基因表达的半定量 RT-PCR 检测

Fig. 5 Detection of myostatin gene expression in *Trachidermus fasciatus* by semi-quantitative RT-PCR

M：DL2000 DNA 相对分子质量标记；1：肌肉；2：肠；3：肝脏；4：脑；5：阴性对照(没有 RNA 模板)；6，阴性对照(肌肉 RNA 不加 RT 酶)。M: DL2000 DNA Marker; 1, Muscle; 2, Small intestine; 3, Liver; 4, Brain; 5, Negative control (no RNA); 6, Negative control (muscle RNA but no reverse transcriptase).

RARR，在 C 端生物活性区含有 10 个保守的半胱氨酸残基，并且具有两个典型的 TGF-β 蛋白结构域：TGF-β 前肽区域和 TGF-β 功能域。完全符合 TGF-β 家族蛋白的特征，与其他物种的 MSTN 蛋白一致。

Maccatrozzo et al(2001)报道在硬骨鱼金鲷(*Sparus aurata*)发现了一种新的似骨骼形成蛋白(sbMSTN-b)基因，它编码的氨基酸序列与金鲷 MSTN 同源性为 68%，而且在石首鱼(*Umbrina cirrosa*)和绿河魨(*Tetraodon nigroviridis*)中也发现了这种基因，系统发生分析表明，MSTN-b 存在于大部分(可能全部)的硬骨鱼中。与此同时，从虹鳟鱼、大西洋鲑鱼、罗非鱼、石鮨鱼中都获得了两种 *MSTN*，而且发现两者间的同源性较高(Maccatrozzo et al，2001；Roberts et al，2001；Rodgers et al，2001a；Rodgers et al，2001b；Rescan et al，2001；Garikipati et al，2006；Garikipati et al，2007；Rodgers et al，2008；Østbye et al, 2001)。 至今在虹鳟鱼中已经发现 *MSTN* 基因的亚家族，有 4 个基因(*MSTN-1a*、*MSTN-1b*、*MSTN-2a* 和 *MSTN-2b*)组成，关于为什么鱼类会存在两种 MSTN 异构体，而高等动物只有一种 *MSTN* 基因，还没有比较合理的解释，认为可能是共同的祖先基因在进化而产生的(Garikipati et al，2006；Garikipati et al，2007；Rodgers et al，2008)。Xie et al(2008)将肌肉生长抑制素基因(*MSTN*)分成 4 个亚家族：哺乳动物 *MSTN*、鸟类 *MSTN* 以及鱼类 *MSTN-1* 和 *2*。本研究我们克隆到的松江鲈 *MSTN* 基因，根据与其他物种的 *MSTN* 基因序列推测，该序列同其他物种的 *MSTN-1* 同源性高，从进化上推测我们发现的松江鲈 *MSTN* 在鱼类 *MSTN-1* 亚家族中，为松江鲈的 *MSTN-1*。松江鲈中是否也存在 *MSTN-2*，将是下一步值得研究的内容。

哺乳类和鱼类 *MSTN* 基因的组织表达存在差异，在小鼠中 *MSTN* 只在骨骼肌中表达(McPherron et al，1997)，此外，MSTN 还在牛的心肌细胞、蒲肯野氏纤维(Sharma et al，1999)和猪的乳腺中(Ji et al，1998)表达。鱼类作为低等脊椎动物，其 *MSTN* 有独特的表达特点(Maccatrozzo et al，2001)。Maccatrozzo et al(2001)报道了在硬骨鱼金鲷发现的一种新的似骨骼形成蛋白(sbMSTN-b)基因，RT-PCR 分析表明，几乎只在中枢神经系统中，且始于幼鱼晚期表达。脑中 sbMSTN-b 的表达量随形态的变化而增加，与神经系统的分化完成同步(Maccatrozzo et al，2001)。与此同时，Roberts et al(2001)从鳟鱼(brook trout)中获得了两个 *MSTN* 基因，其中一种存在于肌肉和大脑；而另一种存在于卵巢中。大脑中的表达位于眼叶、后脑、下丘脑，在排卵时卵巢中的表达是上调的(Roberts et al，2001)。Rescan et al(2001)发现虹鳟鱼的 *MSTN-1* 在多种组织表达，而 *MSTN-2* 仅在脑组织中表达。 在大西洋鲑鱼中也存在两种 MSTN 异构体，两者都不限于在骨骼肌中表达，包括白肌、肠、脑、腮、舌和眼均有表达，MSTN-1 还在红肌、心脏、脾脏、卵巢组织中表达。用多克隆抗体检测，在红肌、白肌、心脏、肠脑发现相对分子质量为 55 k 的前体蛋白，相对分子质量为 25 k 的成熟蛋白见于眼和血清。 用免疫组化方法将鲑鱼的 MSTN 定位于红肌和白肌的胞浆、肠上皮、成牙本质细胞和成釉细胞(Østbye et al，2001)。Rodgers et al (2001b)检测了罗非鱼 MSTN 的组织表达分布，发现其并不仅在肌肉中表达，在其他组织中也有表达。我们对松江鲈 *MSTN* 基因组织表达分布检测发现，该基因不仅在肌肉中表达，而且也在其它组织肠中也有较高的表达，在脑和肝脏中也有微量或痕量的表达，这一结果与其他鱼中的报道基本一致。这也暗示松江鲈 MSTN 的功能可能并不局限在对肌细胞生长抑制，还作用于其他的组织和细胞。

参考文献：

Garikipati DK, Gahr SA, Rodgers BD. 2006. Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes [J]. *J Endocrin,* **190**: 879-888.

Garikipati DK, Gahr SA, Roalson EH, Rodgers BD. 2007. Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic organization, differential expression, and pseudogenization [J]. *Endocrinology,* **148**(5): 2106-2115.

Gu Z, Zhang Y, Shi P, Zhang YP, Zhu D, Li H. 2004a. Comparison of avian myostatin genes [J]. *Anim Genet,* **35**(6): 470-472.

Gu Z, Zhu D, Li N, Li H, Deng X, Wu C. 2004b. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth [J]. *Sci Chn Ser C：Life Sci*, **47**(1): 26-32.

Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FF, Spurlock ME. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: Tissue specificity and developmental and postnatal regulation [J]. *Am J Physiol,* **275** (4 Pt 2): 1265-1273.

Lee SJ, McPherron AC. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **98**(16): 9306-9311.

Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, Rizzo G, Patarnello T. 2001. A

novel second myostatin gene is present in teleost fish [J]. *FEBS Lett,* **509**(1): 36-40.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily membe [J]. *Nature,* **387**: 83-90.

Østbye TK, Galloway TF, Nielsen C, Gabestad I, Bardal T, Andersen Ø. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues[J]. *Eur J Biochem,* **268**(20): 5249-5257.

Rescan PY, Jutel I, Ralliere C. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Exp Biol,* **04**(Pt 20): 3523-3529.

Roberts SB, Goetz FW. 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms [J]. *FEBS Lett,* **491**(3): 212-216.

Rodgers BD, Weber GM. 2001a. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,* **129** (2-3): 597-603.

Rodgers BD, Weber GM, Sullivan CV, Levine MA. 2001b. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops* [J]. *Endocrinology,* **142**(4): 1412-1418.

Rodgers BD, Garikipati DK. 2008. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: A comparative review [J]. *Endocr Rev,* **29**(5): 513-534.

Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ, Bass JJ. 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct [J]. *J Cell Physiol,* **180** (1): 1-9.

Szabo G, Dallmann G, Muller G, Patthy L, Soller M, Varga L. 1998. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice [J]. *Mamm Genome,* **9**(8): 671-672.

Wang JQ, Pan LD, Liang TH, Gan HC. 2004. Preliminary study on embryonic development of the roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus* (Scorpaeniformes: Cottidae) [J]. *J Fudan Univ*: *Nat Sci*, **43**(2): 250-254. [王金秋, 潘连德, 梁天红, 甘华臣. 2004. 松江鲈鱼(*Trachidermus fasciatus*)胚胎发育的初步观察. 复旦大学学报: 自然科学版, **43**(2): 250-254.]

Westhusin M. 1997. From mighty mice to mighty cows [J]. *Nat Genet,* **17**(1): 4-5.

Xie Y, Xue X, Yin H, Tang R, Su Jing, Song K, Hu YT, Wamg H, Yang H. 2008. Homology modeling and molecular evolution analysis of myostatin [J]. *Zool Res*, **29**(5): 485-492. [谢玉为, 薛小平, 尹焕才, 唐蕊华, 苏 婧, 宋 凯, 呼延霆, 汪 桦, 杨 慧. 2008. Myostatin 三维结构模建及分子进化分析. 动物学研究, **29**(5): 485-492.]

Xu JR, Han XL, Yu JF, Bao F, XU P. 2009. Analysis of genetic diversity of *Trachidermus fasciatus* by ISSR [J]. *Freshwat Fisher*, **39**(1): 21-24, 35. [徐建荣, 韩晓磊, 郁建锋, 鲍 峰, 许 璞. 2009. 松江鲈遗传多样性的 ISSR 分析. 淡水渔业, **39**(1): 21-24, 35.]

～～